

Protective Effects of Qing-Gan-Li-Shui Formula on Intraocular Pressure and Retinal Ganglion Cells of Glaucoma Rats

Leilei Wang, Yinjian Zhang*

Department of Ophthalmology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai

Email: zsyf19892@126.com, *zhangyinji@126.com

Received: Mar. 29th, 2015; accepted: Apr. 18th, 2015; published: Apr. 22nd, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objectives: Glaucoma ranks second among those that induce vision loss. Qing-Gan-Li-Shui Formula is derived from Jusheng Zou, an experienced TCM doctor, and exhibited effective for glaucoma. This project is focusing on related basic research on glaucoma rats' intraocular pressure (IOP) and retinal ganglion cells (RCGs). **Methods:** Modeling by occluding episcleral veins. Groups are treated with Qing-Gan-Li-Shui Formula and Timolol Maleate drops, respectively and concurrently. Model group and sham-model group were established as control. We monitored IOP regularly, collected and stained retina with H&E dye to observe RCGs. **Results:** Model of high IOP was established successfully. IOP of Chi-Western Group (9.45 ± 1.04) is better than individual significantly (Chinese Medical Group: 10.50 ± 1.98 ; Western Medical Group: 10.91 ± 1.76). RCGs of Chi-Western Group (53.00 ± 12.33) are more than Chinese Medical Group's (47.80 ± 9.60) and Western Medical Group's (38.00 ± 12.30) significantly. **Conclusions:** Qing-Gan-Li-Shui Formula exhibited protective effects on glaucoma with reduction on IOP and inhibition on RCGs apoptosis.

Keywords

Intraocular Pressure, Glaucoma, Qing-Gan-Li-Shui Formula, Basic Research, Medicine of Doctor of Traditional Chinese Medicine

*通讯作者。

观察清肝利水方对高眼压大鼠眼压及视网膜神经节细胞保护作用

王蕾蕾, 张殷建*

上海中医药大学附属龙华医院眼科, 上海

Email: zsyf19892@126.com, zhangyinj@126.com

收稿日期: 2015年3月29日; 录用日期: 2015年4月18日; 发布日期: 2015年4月22日

摘要

目的: 青光眼是目前致盲的第二大眼病。清肝利水方是上海名老中医邹菊生先生的经验方, 以清肝利水为治则, 临床治疗高眼压型青光眼取得明显疗效。本课题探究该方对高眼压大鼠眼压及视网膜神经节细胞的保护作用。方法: 采用灼伤巩膜上静脉方法阻断房水回流途径建立高眼压大鼠模型, 分别给予清肝利水方、清肝利水方合噻吗心安滴眼液、噻吗心安滴眼液治疗, 另设模型组、假手术组。定时监测眼压变化, 治疗末分离视网膜, 进行H&E染色, 神经节细胞计数并观察视网膜形态结构。结果: 成功稳定建立高眼压大鼠模型; 治疗28天后, 中合西药组(9.45 ± 1.04)降眼压效果优于中药组(10.50 ± 1.98), 且同时优于西药组(10.91 ± 1.76), 且中药参与治疗组降眼压效果和缓稳定。视网膜神经节细胞计数方面, 中合西药组(53.00 ± 12.33)高于中药组(47.80 ± 9.60), 高于西药组(38.00 ± 12.30)。结论: 清肝利水方对高眼压大鼠眼压及视网膜神经节细胞具有保护作用。

关键词

高眼压, 青光眼, 清肝利水方, 基础研究, 中医药

1. 背景介绍

青光眼是由一系列原因引起的以视神经节细胞(Retinal Ganglion Cells, RGCs)进展性退变为特征的视神经性疾病。目前青光眼是世界第二致盲性眼病, 全球约有 6000 万人患有青光眼相关性疾病, 其中约 840 万患者最终失明, 这一数字将于 2020 年分别发展为 8000 万和 1120 万[1]。降眼压是唯一具有循证医学证据的治疗方法[2], 目前降眼压药物主要有前列腺素类、 β 肾上腺素抑制剂、 α 肾上腺素激动剂、碳酸酐酶抑制剂和胆碱能受体激动剂, 但多项研究显示以上药物可能会带来结膜充血、虹膜褪色、葡萄膜炎、黄斑水肿、眼部刺激、干眼症及近视多种局部副作用, 亦可能影响全身状况如头痛、呼吸中止等[3]-[5]。并且部分患者经降眼压治疗后, 视神经节细胞、视神经损害仍在继续。故降眼压、保护视神经节细胞、视神经是重要的研究方向。清肝利水方是邹菊生老先生的经验方, 邹老认为青光眼病位在肝, 情志不舒致肝脏疏泄失常, 气滞久则化火, 肝火上扰于目, 导致玄府郁闭, 神水疏泄不能, 故以清肝利水为治则拟方[6]。该方现已在上海中医药大学附属龙华医院运用数年, 取得良好效果, 相关临床试验显示清肝利水方可以明显改善开角型青光眼患者视力、视野平均敏感度及中医症状[7], 但仍缺少基础研究证据。本文主要探究清肝利水方对高眼压大鼠眼压及神经节细胞的影响, 旨在为青光眼治疗提供新的途径。

2. 材料与方法

2.1. 药品、试剂及仪器

马来酸噻吗洛尔滴眼液(H42021078, 武汉五景药业), 根据人鼠用药剂量比换算配置清肝利水浓缩方(生药由上海中医药大学附属龙华医院提供、熬制), 盐酸丙美卡因滴眼液(H20090082, 比利时); 手持回弹式眼压计(SW-500, 索尔/SUOER), 解剖显微镜(SZX7, OLYMPUS)。

2.2. 实验动物

雄性 SD 大鼠 53 只, SPF 级, 体重 200 ± 20 g, 无眼疾, 由上海中医药大学动物实验中心提供, 饲养场于上海中医药大学动物实验操作中心 SPF 级动物房, 7 h/19 h 照明, 提供充足的水、食物。实验操作均符合上海中医药大学动物操作管理办法。

2.3. 建立模型

建模方法与文献描述[8]相似, 使用 0.25 ml/100 g 3% 戊巴比妥钠对大鼠腹腔注射进行麻醉。针对大鼠左眼建立高血压模型, 常规消毒, 取上下眼睑中点处穿线, 留线 12 cm, 末端用止血钳固定上下牵引; 沿外眼角向颞侧剪开 1 cm, 暴露巩膜; 尖头镊小心夹起 3 点钟球结膜, 用角膜剪剪开, 直至看到瓷白色巩膜, 沿角膜缘后 1 mm 向 12 点钟方向环状剪开 120° , 向 6 点钟方向剪开 90° , 使用自制烧灼器烧灼 11 点, 1 点, 4 点钟方向三根巩膜上静脉, 灼烧后迅速看到角膜缘血管远端充盈(如图 1), 15 min 后复查, 充盈者小心闭合巩膜, 涂以金霉素眼膏, 去除上下眼睑线结, 缝合外眼角, 测眼压。假手术组步骤同前但不予以烧灼; 手术组不成功者烧灼右眼相应镜面位置巩膜上静脉补做右眼模型。

2.4. 分组及给药

术后常规给予金霉素眼膏预防感染, 术后 3 天待模型眼压稳定, 根据眼压随机分为模型组(10 只),



左侧橘色箭头所指为烧灼前血管, 右侧橘色箭头所指为烧灼后血管

Figure 1. Episcleral venous occlusion

图 1. 巩膜上静脉灼烧

中药组(12 只), 中合西药组(12 只)和西药组(11 只), 另设假手术组(8 只)。中药组按照 1.5 ml/200g 体重给予清肝利水方灌胃合生理盐水外用滴眼, 西药组按照 1.5 ml/200g 体重给予生理盐水灌胃合马来酸噻吗洛尔滴眼液外用, 中合西药组按照 1.5 ml/200g 体重给予清肝利水方灌胃合马来酸噻吗洛尔滴眼液外用, 假手术组和模型组予以等量生理盐水灌胃及滴眼外用, 治疗维持 28 d。

2.5. 监测眼压

术前、术后、术后 1 d、3 d、1 w、2 w、3 w、4 w 由同一人中午 12 时左右使用手持回弹式眼压计检测各组大鼠患眼眼压 2 次, 取平均值, 记录。

2.6. 取材及标本制作

实验结束后称取大鼠体重, 按照 0.2 ml/100g 腹腔注射 3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 完整取出眼球, 保留视神经 3 mm, 剥除多余肌肉附着组织, 迅速置于 4% 多聚甲醛溶液中, 固定 24 h 后, 沿角膜缘剪开眼球, 去除角膜及晶体, 保留视杯, 再次置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h。

2.7. H&E 染色及神经节细胞计数

取经 4% 多聚福尔马林缓冲液固定的大鼠视杯标本经常规脱水、石蜡包埋, 以视神经为中心, 行冠状位切片, 取视神经乳头前 3 mm 处做 5 μ m 连续切片 4 张, 制作标本。H&E 染色, 光镜观察视网膜形态学改变。2 人分别随机选择每个切片中的 3 个视野进行视网膜神经节细胞计数, 取平均值。

2.8. 数据统计分析

使用 SPSS 18.0 对数据进行分析, 进行正态性检测, 继而采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

3. 实验结果

3.1. 建立高血压大鼠模型

造模过程中无大鼠死亡, 模型组术前眼压(7.00 ± 0.47) mmHg, 术后眼压(14.70 ± 1.64) mmHg, 模型组术前术后眼压比较显著增高($P < 0.01$); 假手术组术前(7.00 ± 0.53) mmHg、术后(7.62 ± 0.92) mmHg 眼压比较无明显变化($P > 0.05$), 其他各组术前术后眼压变化如表 1 所示。整个实验过程中假手术组与模型组眼压相比, 均存在显著差异(表 2), 表明造模成功且在实验过程中维持稳定。

Table 1. Body weight (BW) or intraocular pressure (IOP) of rats before and after occluded operation

表 1. 各组大鼠体重及造模前后眼压

组别	N	体重	术前眼压	术后眼压
假手术组	8	208.50 \pm 3.93	7.00 \pm 0.53	7.62 \pm 0.92
模型组	10	208.70 \pm 6.31	7.00 \pm 0.47	14.70 \pm 1.64*
中药组	12	207.25 \pm 9.00	6.33 \pm 0.65	16.08 \pm 4.21* [▲]
中+西药组	12	202.83 \pm 6.41	6.50 \pm 1.00	15.08 \pm 3.42* [▲]
西药组	11	205.55 \pm 9.86	6.82 \pm 0.98	16.36 \pm 4.72* [▲]

注: *与假手术比较 $P < 0.01$; [▲]与模型组相比 $P > 0.05$ 。

各组大鼠体重及术前眼压无统计学差异, 造模后假手术组与其余 4 组比较, $P < 0.01$, 说明术后眼压有统计学差异, 而其余 4 组之间术后眼压比较无统计学差异。

3.2. 清肝利水方对大鼠眼压的影响

3.2.1. 治疗末各组眼压比较

治疗过程中，中合西药组大鼠死亡 1 只，治疗末实验大鼠共 52 只。如表 3 所示，治疗 28 天后，模型组大鼠眼压有一定程度下降，但与假手术组比较， $P < 0.05$ ，表示模型依然成立。与模型组比较，中合西药组 $P < 0.05$ ，存在统计学差异。

3.2.2. 治疗 28 天各组眼压变化趋势

图 2 为各组大鼠术前、术后、术后 1 d、3 d、术后 1 w、2 w、3 w 及 4 w 的眼压变化趋势图。模型组及三个治疗组相较术后初始眼压均有下降。但西药治疗组眼压起伏较大，中合西药组和中药组下降趋势和缓稳定。

3.3. 视网膜形态结构及神经节细胞计数

3.3.1. 视网膜各层形态结构

光镜下观察各组视网膜形态结构，如图 3 所示，可见模型组层次结构尚清晰，内核层、外核层细胞排列疏松紊乱，内核层及外核层细胞层数较少；各治疗组视网膜层次较清晰，中药组、中合西药组细胞排列整齐、有序，内外核层细胞层数较多，西药组内外核层细胞层数也较多，但细胞排列无序，且神经节细胞个数略少于中药组、中合西药组。

3.3.2. 视网膜神经节细胞计数

2 人分别随机选择每个切片中的 3 个视野进行视网膜神经节细胞计数，进行统计。如表 4 所示，治

Table 2. IOP of rats in normal group and model groups in different time points

表 2. 假手术组与模型组术前、术后、术后 1 周、术后 2 周、术后 3 周及术后 4 周的眼压比较

组别	假手术组	模型组
术前	7.00 ± 0.53	7.00 ± 0.47
术后	7.62 ± 0.92	14.70 ± 1.64*
术后 1 周	8.25 ± 1.49	13.10 ± 1.37*
术后 2 周	7.63 ± 0.74	10.10 ± 1.20*
术后 3 周	7.50 ± 1.31	10.70 ± 0.95*
术后 4 周	9.13 ± 0.83	10.90 ± 1.60 [▲]

注：*模型组与假手术组比较 $P < 0.01$ ；[▲]模型组与假手术组比较 $P < 0.05$ 。

Table 3. IOP of rats after treatment

表 3. 治疗 28 天后各组大鼠眼压

组别	N	28 d 治疗末眼压
假手术组	8	9.13 ± 0.83
模型组	10	10.90 ± 1.60*
中药组	12	10.50 ± 1.98
中 + 西药组	11	9.45 ± 1.04 [▲]
西药组	11	10.91 ± 1.76*

注：*与假手术比较 $P < 0.05$ ；[▲]与模型组相比 $P < 0.05$ 。

与假手术组比较，中药组、中合西药组 $P > 0.05$ ，表示治疗末与假手术组比较，中药组、中合西药组眼压无统计学差异；与模型组比较，中合西药组 $P < 0.05$ ，表示治疗末与模型组比较，中合西药组眼压存在统计学差异。

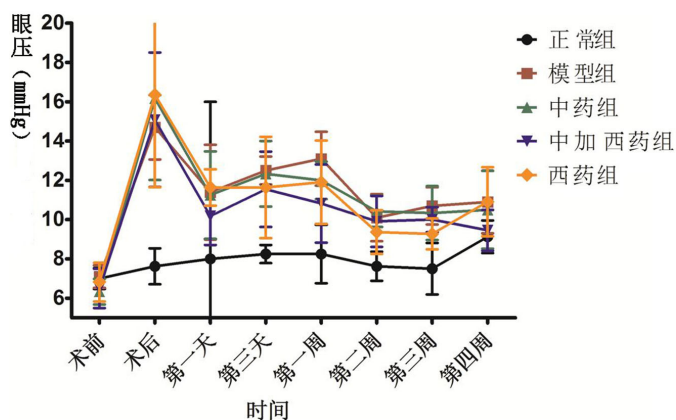
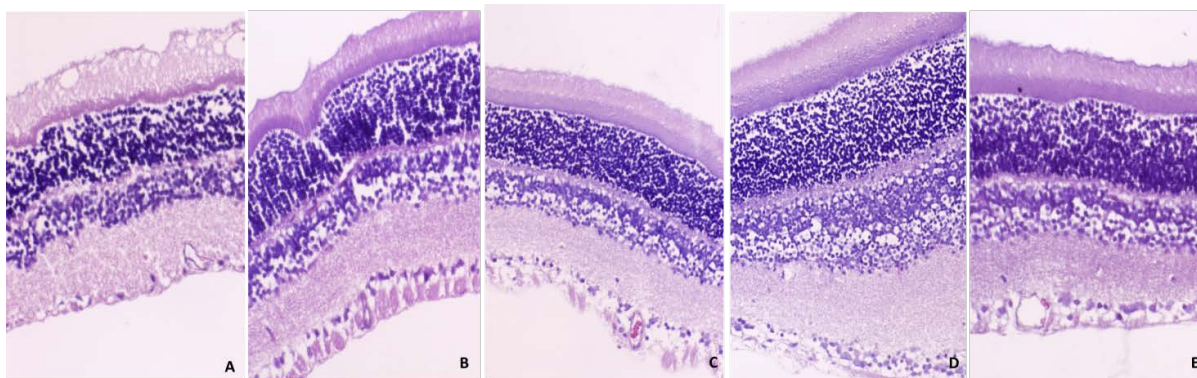


Figure 2. Tendency of IOP in different groups and different time points
图 2. 各组大鼠术前、术后、术后 1 d、3 d、术后 1 w、2 w、3 w、4 w 眼压变化趋势图



A: 模型组, B: 正常组, C: 中药组, D: 中合西药组, E: 西药组

Figure 3. H&E staining of retinas with 400 magnifications
图 3. 视网膜 H&E 染色(×400)

Table 4. Quantification of retinal ganglion cells after treatment
表 4. 治疗 28 天后各组大鼠视网膜神经节细胞计数

组别	N	RGC 计数
假手术组	8	43.00 ± 7.79
模型组	10	27.00 ± 10.93*
中药组	12	47.80 ± 9.60 [▲]
中 + 西药组	11	53.00 ± 12.33 [▲]
西药组	11	38.00 ± 12.30

注: *与假手术比较 $P < 0.05$; [▲]与模型组相比 $P < 0.05$ 。

与假手术组比较, 模型组 $P < 0.05$; 与模型组比较, 中药组、中合西药组 $P < 0.05$, 表示治疗末与模型组比较, 中合西药组、中药组视网膜神经节细胞个数存在统计学差异。

疗 28 天后, 模型组视神经节细胞明显少于假手术组, 中药组、中合西药组及西药组均不同程度保护神经节细胞凋亡, 但中药组、中合西药组与模型组相比, $P < 0.05$, 具有统计学意义。

4. 讨论

青光眼在中医属“五风内障”范畴, 由于阴阳偏盛、气机失调等诸种原因, 导致气血失和、经脉不

利，目中玄府闭塞、气滞血瘀、神水瘀积而发病。神水淤积、气滞血瘀为标实，气机不疏、阴阳不调为因。此外，张新静[9]查阅 1979 年至 2010 年的 CNKI 文献及陈达山等多位专家的医著中有关青光眼证型及用药情况，结果显示青光眼证型出现次数居前三位的分别为：肝郁气滞(66.3%)，肝肾亏虚(48.2%)，阴虚火旺(45.8%)；药物使用频率居前三位的分别为茯苓(42.42%)，川芎(28.03%)，当归(27.27%)。故治疗应疏肝利水、调理阴阳并重。清肝利水方是邹菊生老先生治疗青光眼的经验方。邹老认为本病从肝论治，肝主疏泄，肝开窍于目，肝郁化火。处方中以夏枯草为君药，清肝明目；葛根、槟榔清肝利水；猪苓、茯苓、车前子、甜葶苈利水；川芎、玄胡索行气活血止痛；玄参、牛膝活血，牛膝可引血下行；桔梗行气；细辛性温，入心肝胆脾四经，能祛风行水开窍，阴中求阳，现代药理提示具有麻醉止痛作用；五味子敛瞳，安神。

观察清肝利水方对高眼压大鼠眼压及视网膜神经节细胞影响，治疗 28 天末中合西药组效果优于中药组，两组都优于西药组；观察疗程眼压下降趋势，相较西药组，中合西药组与中药组效果稳定和缓；观察各组视网膜神经节细胞改变，中合西药组效果优于中药组，且两组明显优于西药组。以上结果说明清肝利水方降眼压、保护视网膜神经节细胞有一定效果。近年研究表明[10]，青光眼是个瀑布叠式反应，视功能损伤是由高眼压引发的各种生理病理学改变直接或间接导致，如氧化应激、氨基酸毒性等，单纯降眼压不能完全阻断视功能的进行性损伤。现代医学研究表明，该方组成药物之一葛根提取物葛根素能够通过抑制过氧亚硝基阴离子的表达抑制氧化应激[11]，调节 Bcl-2 及 Bax 表达[12]保护视神经；同时邹老师从大量临床案例中观察到葛根能够扩张血管，具有降眼压作用。决明子提取物可通过影响血管钙通道和电位依赖性钙通道的开放舒张血管，减少血管内皮细胞 iNOS 产生，增加 NO 释放[13]。综上所述，清肝利水方可能通过以上几种药物单独或相互作用发挥降眼压、保护视网膜神经节细胞等作用。

5. 结论

清肝利水方能够降眼压、保护视网膜组织结构及抑制视神经节细胞，是一种针对高眼压型青光眼良好的治疗方法。

基金项目

上海市市属博士学科点建设基金(上海市卫生局 2006T004A)。

参考文献 (References)

- [1] Cook, C. and Foster, P. (2012) Epidemiology of glaucoma: What's new? *Canadian Journal of Ophthalmology*, **47**, 223-226.
- [2] Weinreb, R.N., Aung, T. and Medeiros, F.A. (2014) The pathophysiology and treatment of glaucoma: A review. *JAMA*, **311**, 1901-1911.
- [3] Chen, R., Yang, K., Zheng, Z., Ong, M.L., Wang, N.L. and Zhan, S.Y. (2014) Meta-analysis of the efficacy and safety of latanoprost monotherapy in patients with angle-closure glaucoma. *Journal of Glaucoma*.
- [4] Li, J., Lin, X. and Yu, M. (2015) Meta-analysis of randomized controlled trials comparing latanoprost with other glaucoma medications in chronic angle-closure glaucoma. *European Journal of Ophthalmology*, **25**, 18-26.
- [5] Stewart, W.C., Konstas, A.G., Nelson, L.A. and Kruff, B. (2008) Meta-analysis of 24-hour intraocular pressure studies evaluating the efficacy of glaucoma medicines. *Ophthalmology*, **115**, 1117-1122.e1111.
- [6] 张殷建 (2010) 邹菊生辨治原发性开角型青光眼经验. *上海中医药杂志*, **2**, 11-13.
- [7] 董志国, 张殷建, 刘新泉 (2013) 清肝利水明目法对肝郁气滞型原发性开角型青光眼视功能保护的临床研究. *中国中医眼科杂志*, **5**, 336-339.
- [8] Shareef, S.R., Garcia-Valenzuela, E., Salierno, A., Walsh, J. and Sharma, S.C. (1995) Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Experimental Eye Research*, **61**, 379-382.

- [9] 张新静, 刘玲 (2010) 从青光眼辨治规律论房水属肝理论. *山西中医*, **10**, 47-48.
- [10] Rieck, J. (2013) The pathogenesis of glaucoma in the interplay with the immune system. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, , **54**, 2393-2409.
- [11] 韩瑶, 赵娟, 郭黎霞, 冯晶晶, 刘振通 (2008) 急性高眼压兔眼视网膜中过氧亚硝基阴离子的表达及葛根素对其表达的影响. *河北医科大学学报*, **6**, 839-842, 868.
- [12] 陈翠, 王镇 (2013) 葛根素对急性高眼压后大鼠视网膜 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响. *中国药物与临床*, **10**, 1283-1284.
- [13] 毛万姮, 商黔惠, 刘爱东, 吴芹, 姜黔峰 (2010) 决明子提取物对大鼠主动脉扩血管作用的机制. *中华高血压杂志*, **1**, 60-64.